

⑩日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

昭54-113417

⑬Int. Cl.<sup>2</sup>  
A 61 K 9/00

識別記号

⑭日本分類  
30 C 4

庁内整理番号  
7057-4C

⑮公開 昭和54年(1979)9月5日

発明の数 5  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑯リポゾームデリバリーシステム

アメリカ合衆国ニュージャージー  
イ州07950モリス・ブレインズ  
・カントリーウッドドライブ28  
⑰出願人 サンド・アクチエンゲゼルシャ  
フト  
スイス国バーゼル(番地なし)  
⑱代理人 弁理士 小田島平吉

⑲特 願 昭54-7307

⑳出 願 昭54(1979)1月26日  
優先権主張 ㉑1978年1月27日㉒米国(US)  
㉓872835

㉔発明者 ローレン・アロイシアス・ケリ

明 細 書

1 【発明の名称】

リポゾームデリバリーシステム

2 【特許請求の範囲】

1. ステロール及び水中でミセルを形成することが出来る脂肪族脂質を含有するリポゾーム内に薬物が包み込まれている、リポゾーム薬物デリバリーシステム。
2. ステロールがコレステロール、 $\beta$ -シトステロール、デスモステロール、7-ケト-コレステロール、 $\beta$ -コレスタノール又はエストラジオールである、特許請求の範囲第1項記載のデリバリーシステム。
3. ステロールがコレステロール又は $\beta$ -シトステロールである、特許請求の範囲第2項記載のデリバリーシステム。
4. 脂肪族脂質が $C_6 \sim C_{18}$  飽和又は不飽和脂肪

酸のナトリウム塩又はカリウム塩である、特許請求の範囲第1～8項のいずれかに記載のデリバリーシステム。

5. 脂肪族脂質が $C_{16} \sim C_{18}$  不飽和脂肪酸のナトリウム又はカリウム塩である特許請求の範囲第4項記載のデリバリーシステム。

6. ステロールがコレステロールでありそして脂肪族脂質がオレイン酸ナトリウム又はカリウムである、特許請求の範囲第1項記載のデリバリーシステム。

7. 薬物がインシュリンである、特許請求の範囲第1～8項のいずれかに記載のデリバリーシステム。

8. 薬物が麦角アルカロイドである特許請求の範囲第1～7項のいずれかに記載のデリバリーシステム。

9. 脂肪族脂質、ステロール及び水の重量割合

音波処理が与える。

複雑な磷脂質を使用することなく薬剤を包み込むことができるリボゾームを製造しうることが見出された。磷脂質の代わりに、水中でミセルを形成することができる脂肪族脂質が使用される。

従つて、本発明は、ステロール及び水中でミセルを形成しうる脂肪族脂質を含有するリボゾーム内に薬物が包み込まれているリボゾーム薬物デリバリーシステムを提供する。

脂肪族脂質は、臨界ミセル濃度 (CMC) 以上の濃度で存在する場合水性媒体中でミセルを形成する任意の製薬的に許容しうる脂肪族表面活性化化合物であることができる。ミセルとは水性媒体中の界面活性剤分子のコロイド的大きさの集合体であつて、その中において分子が親水性末端を外側にし親油性末端を内側にして配向しているものである。好ましくは、脂肪族脂質は  $C_{12}$  飽和又

は不飽和脂肪酸のナトリウム又はカリウム塩である。適当な酸は酪酸、イソ吉草酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。塩はより好ましくは不飽和脂肪酸の塩、とくに 14~18 の炭素原子の不飽和脂肪酸の塩である。オレイン酸ナトリウム及びカリウムがとくに好ましい。

ステロールは、上記脂肪族脂質とリボゾームを形成する能力がある任意の製薬的に許容できるステロールである。好ましいステロールはコレステロール、 $\beta$ -シトステロール、デスモステロール、7-ケト-コレステロール、 $\beta$ -コレスタノール及びエストラジオール、とくにコレステロール及び $\beta$ -シトステロールである。

包み込まれる (to be encapsulated) 薬物の性質は重要でない。適当な薬物はワクチン及び抗

原、並びに薬剤を含む。適当な薬剤はホルモン、例えばインシュリン、炭角アルカロイド、例えばジヒドロエルゴトキシン、ジヒドロエルゴタミン及びブロモクリプテン (bromocryptine) 並びにアノレティクス (anoretics)、例えばマジンドール (mazindol) を含む。

本発明はまた

a) ステロールの固体結晶を脂肪族脂質及び薬物の水性ミセル溶液と接触させ、生成する液晶を超音波照射によりリボゾームに転換するか、

b) ステロールを、脂肪族脂質及び薬物を含む水性媒体と水と混和しうる溶媒との混合物中に溶解し、溶媒を蒸発させるか、又は

c) ステロール及び薬物を普通の溶媒に溶解し、溶媒を蒸発させ、残渣を脂肪族脂質の水性ミセル溶液と接触させ、生成する液晶を超音波照射によりリボゾームに転換する、

リボゾームデリバリーシステムの製造方法を提供する。

プロセス図様 a) においては、ステロール結晶を 60℃ までの温度、好ましくは 20~50℃、より好ましくは 25~45℃ の温度でミセル溶液と接触させる。ミセルによるステロール結晶の浸透 (penetration) は 2~60 分を要し、超音波処理 (sonication) は、浸透が完了しそして液晶システムが形成された後にのみ行うべきである。

プロセス図様 b) においては、水混和性溶媒は適当にはアセトン、ジオキサン又は  $C_1 \sim 4$  アルコールである。ステロールは攪拌しながら 60℃ までの温度で、好ましくは 20~50℃ の温度で溶解する。水混和性溶媒の蒸発は超音波照射を要することなく液晶をリボゾームに変える。

プロセス図様 c) は、包み込まれる薬物が脂肪族脂質の水性ミセル溶液に溶解しない場合に適し

うるから、経口投与が好ましい。経口投与について、リボゾーム懸濁液は製薬的に許容できる希釈剤又は担体及びフレーバリング (flavouring) 及び着色剤のような通常の補薬と混合することができ、そしてシロップ、エリクシル、カプセル等の形で投与することができる。非経口的投与の場合、濃縮又は単離したリボゾームは適当な担体液体、例えば殺菌蒸留水又は生理的食塩水溶液中に懸濁することができる。坐薬投与を使用することもできる。

以下の例は本発明を例示する。

#### 実施例 1

二つの濃度の牛のインシュリン溶液を調製した。

1) 2500 国際単位 (IU) すなわち  
102.9 ㎍ (比活性 (specific activity) =  
24.8 単位/㎍) を 16 g/L オレイン酸ナトリウム水溶液 5 ml に溶解した。

氷のバケツ中に置いた。超音波処理後、リボゾーム含有システムの最終組成は、

組成物 A) 500 IU/ml インシュリン =  
20.9 ㎍/ml  
コレステロール = 4 ㎍/ml  
オレイン酸ナトリウム = 16 ㎍/ml

組成物 B) 250 IU/ml インシュリン =  
10.4 ㎍/ml  
コレステロール = 4 ㎍/ml  
オレイン酸ナトリウム = 16 ㎍/ml

であつた。

リボゾーム組成物 A) 及び B) の懸濁液を、投与される体重 10 g 当り懸濁液 0.1 ml の割合で、経口的にマウスに与えた。これは組成物 A) の 5000 IU/kg 又は組成物 B) の 2500 IU/kg に相当する。

牛の膵臓インシュリン (シグマケミカル (Sigma Chemical)) のように、組成物 A) を注射 (i. m.)

2) 又 1250 国際単位すなわち 51.45 ㎍ (比活性 = 24.8 単位/㎍) を 16 g/L オレイン酸ナトリウム水溶液 5 ml に溶解した。

インシュリン調製物 (1) 及び (2) の各々をコレステロール 20 ㎍ を含有する 10 ml のビーカーに移した。コレステロール 200 ㎍ をクロロホルム 10 ml に溶解し、次いでその溶液の 1 ml を 10 ml のビーカーに入れ、遠室下室温で溶媒を除去することによつてコレステロールを調製した。各々のビーカーを遠室でフラッシュし、プラスチックフィルムで被覆し、37℃ の水浴中に入れ、1 時間振とうしコレステロール結晶を侵透させた。ついで液晶懸濁液をビオソニック IV ウルトラソニックジェネレーター (ブランウィル) (Biosonik IV Ultrasonic Generator (Brownwill)) で直径 4 mm のプローブを用いて 2 回 1 分間超音波処理 (sonication) した。ビーカーは超音波処理の間

のために 1:10 に希釈し、そして 10 IU/kg で投与した。

2 時間及び 4 時間後、85 ㎍/kg のヘキシバルビタールナトリウム (i. p.) で麻酔しそして心臓穿刺により血液を集めることによつてこの動物を犠牲にした。集めた血液をヘパリン 0.025 ml、1000 単位/ml を含有するオートアナライザーカップ (Auto Analyser Cup) 中に入れた。血液試料にふたをし、振とうし、そして水バケツ中に保存した。オートアナライザーフェリシアン化カリウム法 *N*-26 によりグルコースを測定した。

p. o. ルートで与えても i. m. ルートで与えても、カルボキシメチルセルロースは血中グルコースに対して何の影響も与えなかつた。従つて、試験物質は、p. o. 又は i. m. で与えても、カルボキシメチルセルロース対照物と関係付けることができる。

本発明のリボゾーム中のインシュリン5000 IU/kgを経口投与後4時間で血中グリコース量の明らかな低下がみられる。i. m. ルートにおいて、10 IU/kgでリボゾームに包み込んだインシュリンは包み込んでいないインシュリンに相当する活性を有していた。このことは、インシュリンをリボゾームに入れることによりインシュリン活性が影響を受けないことを示す。

組成物A)のリボゾームをまた、ワイスマン等(Weissmann, G., et al.), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 88-92 (1975); セッサ及びワイスマン(Sessa, G. & Weissmann, G.), J. Biol. Chem. 245: 8295-8801 (1971); ワイスマン、ブランド及びフランクリン(Weissmann, G., Brand, A. & Franklin, E. C.), J. Clin. Invest. 58: 586-548 (1974), 及びワイスマン及

ブリタ(Weissmann, G. & Rilo, G. A.), Nature 240: 167-172 (1972)の記載に従つて、牛のインシュリン500 IU/mlの存在下に製造した正及び負の両方に帯電しているレシチン-コレステロールリボゾームと比較した。

本発明のリボゾーム及びレシチンリボゾームは共にマウスで試験し、上記のように分析した。

結果を第III表に示す。

第 III 表

血中グルコース (MG/100ML)					
処 理	ル ー ト	2時間後	%△	4時間後	%△
対 照 カルボキシメチル セルロース	p. o.	112.0 ±5.9	---	92.7 ±6.7	---
A) 5000 IU/kg	p. o.	47.6 ±10.8	58↓ P<0.01	70.2 ±8.7	24↓ P=N.S.
L. C. (+) 5000 IU/kg	p. o.	105.8 ±17.8	17↓ P=N.S.	92.8 ±5.8	0 P=N.S.
L. C. (-) 5000 IU/kg	p. o.	88.9 ±7.6	21↓ P<0.05	91.5 ±12.5	1↓ P=N.S.
A) 5 IU/kg	i. m.	24.8 ±2.5	78↓ P<0.001	21.0 ±2.7	77↓ P<0.001
L. C. (+) 5 IU/kg	i. m.	81.8 ±2.6	72↓ P<0.001	24.8 ±3.1	74↓ P<0.001
L. C. (-) 5 IU/kg	i. m.	29.0 ±3.5	74↓ P<0.001	18.8 ±1.6	80↓ P<0.001

assay)を行つた。該方法はジヒドロエルゴトキシ  
ン含有溶液とフアンワーク試薬の等量を混合し、  
80分間放置し、濾過しそして550nmでのこ  
の溶液の吸収度を標準ジヒドロエルゴトキシと  
フアンワーク試薬の混合物の吸収度と比較する方  
法である。フアンワーク試薬は、蒸留水700ml  
と濃硫酸1800mlの混合物中にp-シメチルア  
ミノベンズアルデヒド2.5gを溶解し、5%塩化  
第1鉄溶液4mlを加え、そして蒸留水により2リ  
ットルとすることにより調製する。

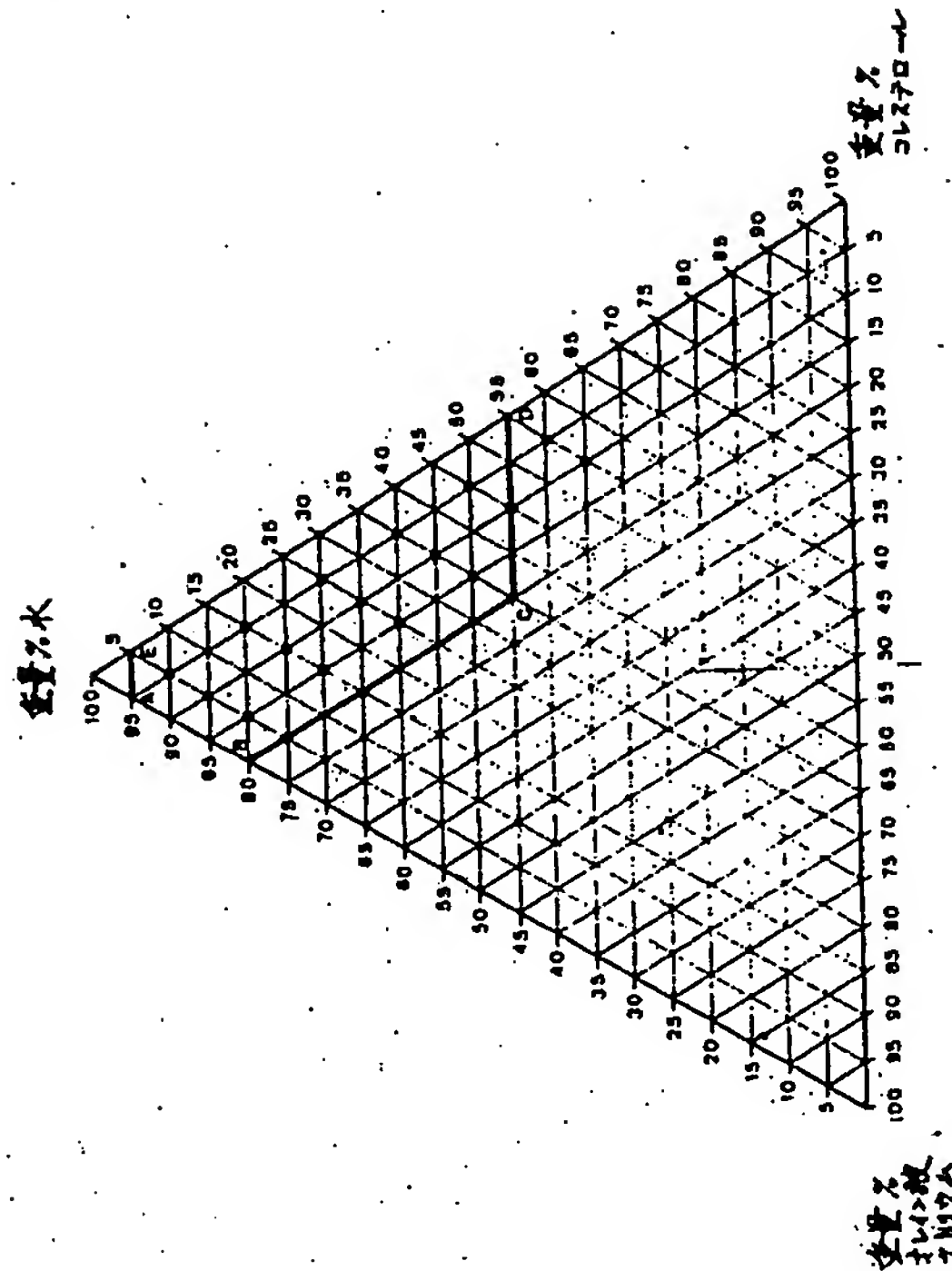
結果は、自由フラクション中のジヒドロエルゴ  
トキシン濃度に変化がないことを示した。このこ  
とはジヒドロエルゴトキシンの少くともある部分  
がリボゾーム中に包み込まれていたことを示す。

#### 4 【図面の簡単な説明】

第1図は三成分システム、オレイン酸ナトリウ  
ム/コレステロール/水の状態図である。

図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.1



#### 手続補正書(方式)

昭和54年2月28日

特許庁長官 熊谷 啓 殿

##### 1. 事件の表示

昭和54年特許願第7807号

##### 2. 発明の名称

リボゾームデリバリーシステム

##### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 スイス・バーゼル(書地なし)

名称 サンド・アクトエンゲルシャフト  
(氏名)

##### 4. 代理人 107

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号  
日本自転車会館

氏名 (5078) 弁護士 小田 島 平 吉

住所

氏名

##### 5. 補正命令の日付

昭和54年2月23日

特許庁

##### 6. 補正の対象

図面

##### 7. 補正の内容

別紙の通り

図面の浄書(内容に変更なし)